云 南 植 物 研 究 1988; 10 (4): 396—402
Acta Botanica Yunnanica

马铃薯试管诱导结薯方法的改进

何静波 段金玉 万 勇 王 军
(中国科学院昆明植物研究所，昆明) (云南师范大学生物系，昆明)

摘要 本研究对马铃薯试管诱导结薯的方法作了一些改进。用带有4—5个节的马铃薯无病毒茎段，在加有生长因子的MS液体培养基中作浅层静置培养，2—3周后，可长成3^2—4^2个枝条。此时，将诱导结薯的液体培养基加入同一容器内，培养1—3周后，小植株的多数茎节上开始出现气生小块茎。再经过3—4周的培养，小块茎成熟并具有发芽能力，可以收获作为无病毒超级原种加以应用。这种改进了的方法可以大大缩短无病毒小薯的生产周期，节约成本、提高产量。讨论了激素等培养条件对小块茎形成的影响和将试管诱导结薯技术应用于马铃薯无病毒种薯生产的前景。

关键词 试管结薯；马铃薯无病毒种薯生产

在离体培养条件下，诱导马铃薯无病毒植株产生气生小块茎，是一项新兴的生物工程技术。利用此项技术，不仅能保证马铃薯的繁殖材料不受外界环境中病原物（包括真菌、细菌和病毒）的侵染，而且能较常规的大田繁殖方法大大缩短无病毒种薯的生产周期，提高繁殖速度和繁殖系数。试管小薯的体积小、重量轻、较之大田生产的常规薯，更便于优良种质的保存、运输和推广。因而这一生物工程技术在马铃薯生产上，特别是无病毒种薯的生产上，具有广阔的应用前景。它已引起了国内外学者的普遍重视，并有不少研究成果发表[1—8]。

材 料 和 方 法

1.**材料** 先后供作试验的品种共8个：Ackersegen、B-71240-2、Huinkul、I-1035和Serrana引自国际马铃薯研究中心，小×多、中心-22和呼薯一号引自中国科学院北京植物研究所。

以上8个品种（系）的植物材料均为继代繁殖的无病毒试管苗。

2.**方法** 培养小植株和诱导结薯的整个方法流程如图1所示。这个流程基本上可分为以下两个阶段。

（1）小植株的快速增殖 迅速繁殖大量的无病毒试管小苗是大量诱导试管结薯的先决条件。我们的方法是将一段离体培养的带有4—5个节的无病毒马铃薯茎段，在无菌

1987-10-30收稿

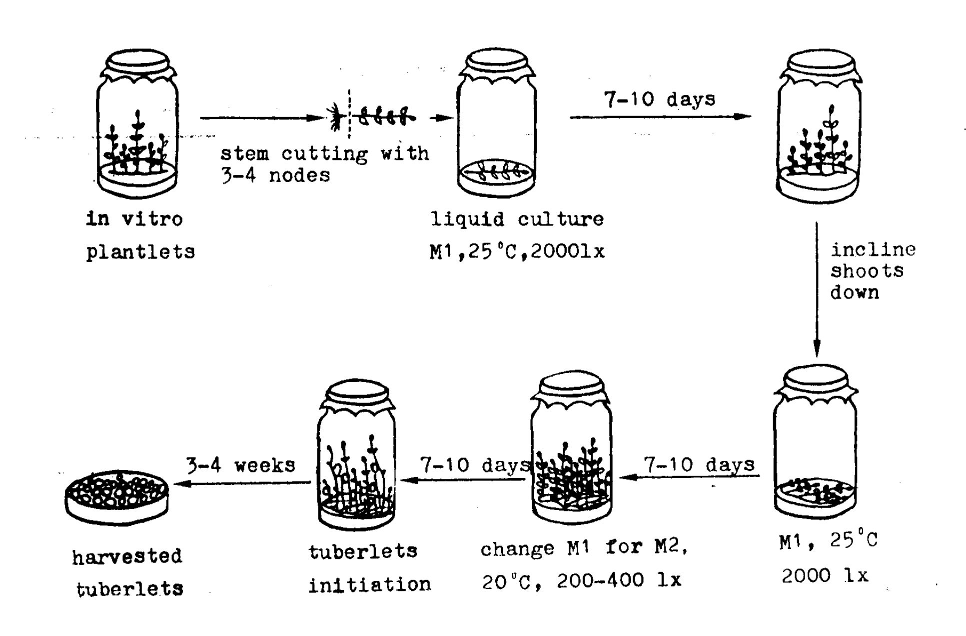


图 1　马铃薯试管诱导结薯的程序

Fig. 1　Schematic representation of *in vitro* tuberization.

条件下转接到盛有液体培养基的果酱瓶或锥形瓶中静置培养。培养基为 MS 基本培养基附加BAP0.5 mg/l、GA_3 0.2 mg/l和蔗糖 2 %（代号M1）。pH 调整到5.8—6.0。培养温度22—25°C、光照为2000—4000 lx 每日10—12小时。培养 7 —10天后，从茎段的每个节上长出新的侧枝，长度为 1 — 3 cm 不等。每个侧枝上已具有 4 — 5 个节。此时，将培养瓶轻轻晃动，使这些新长出的侧枝倾倒入培养液中，再过 7 —10天，从这些卧倒了的侧枝节上又长出新的二级枝条。利用此种方法，一条具有 4 — 5 个节的茎段，在同一个培养容器内经过 2 — 3 周的培养，即可增殖为3^2—4^2个枝条的苗丛。这些生长良好的苗丛，枝条相互支持，直立生长，为下一步诱导大量气生块茎的形成，奠定了基础。

（2）试管结薯的诱导　我们筛选出的诱导结薯培养基为 MS + BAP 5.0 mg/l + 蔗糖 8 %（亦可用食用白糖代替），此种培养基代号为M2。在M2培养基中，还可以加入不同浓度的CCC，β-蜕皮激素等生长调节物质，以试验其诱导结薯的作用。在无菌条件下，将培养瓶中M1培养液倒掉，换入M2培养液，诱导试管结薯。

在诱导结薯阶段采用散射的弱光照（200—400 lx）培养，每天光照约10小时，培养温度控制在20—22°C左右。

以上两阶段培养条件的区别见表 1。

结　果　和　讨　论

1.激素对诱导结薯的影响

表 1　快速增殖小苗和诱导结薯阶段培养条件的差异

Table 1　A comparison of culture conditions in shoot proliferation and tuber induction phases

培养条件 Conditions	快速增殖小苗阶段 Shoot proliferation	诱导结薯阶段 Tuber induction
培养基 Media*	MS +	MS +
维生素B1 VB1	0.4 mg/l	0.4 mg/l
泛酸钙 Ca pantothenic acid	2.0 mg/l	
赤霉素 GA3	0.25 mg/l	
6-苄氨基嘌呤 BAP	0.5 mg/l	5.0 mg/l
矮壮素 CCC*		50 mg/l
β-蜕皮激素 β-ecdysone**		2.0 mg/l
蔗糖 Sucrose	2.0%	8 %
光照 Illumination	2000 lx 10—12 h	200—400 lx, 10 h
温度 Temperature	22—25℃	20—22℃

* 快速繁殖小苗阶段培养基代号为M1；诱导结薯阶段的培养基代号为M2。

** 在MS培养基上附加CCC和β-ecdysone的培养基代号为M3。

* For shoot proliferation phase, the medium is given the code name M1. For tuber induction phase, M 2 .

** These regulators are not necessary to be added, if added, the medium is named as M3.

我们在M2培养基中沿用了Tovar等[6]所推荐的BAP的浓度，得到了肯定的结果。但是，关于CCC的诱导结薯作用，则表现得不肯定。在弱光照（200—400 lx）下，供试的 6 个品种，其结薯数量和每瓶薯块总重量，有随着 CCC 浓度的增加而减少的趋势（表 2）。似乎 CCC 的添加，对小薯的诱导，反有抑制作用。在这一点上，我们的试验结果与前人[6，9]的结果不同，有待进一步研究。

在M2培养基中添加低剂量的CCC（50mg/l）和β-蜕皮激素（2mg/l）[10]，成为M_3培养基。此种培养基对 3 个供试品种薯块的增重和对“中心22”薯块数量的增加，有促进作用（表 3）。

2.食用白糖与蔗糖作用的比较

结薯培养基中的碳源通常为化学纯的蔗糖，浓度高达 8 %，是培养基中成本最高的部分。为降低成本，我们试用普通的白糖代替蔗糖。结果表明，使用白糖或蔗糖对结薯数量的影响，没有明显差异，且白糖对促进薯块数量的增加有良好的影响（表 4）。由于白糖的价格仅为蔗糖价格的 1／7—1／8，所以用白糖代替蔗糖可大大降低成本。

3.培养和操作方法的简化和改进

Tovar等所报道的方法[6]，从单节繁殖到试管诱导结薯，需要经过单节培养成苗一

表 2　弱光照下CCC对试管结薯的影响

Table 2　Effect of CCC on *in vitro* tuberization under low intensity of illumination

	Content of CCC (mg/l)									
	0		100		300		500		700	
供试品种 Genotypes	No.	T. W (mg)	No.	T. W (mg)	No.	T. W (mg)	No.	T.W (mg)	No.	T. W (mg)
Ackersegen	2.3	173.0	3.0	141.6	1.6	110.0	1.3	75.0	1.3	76.6
B-71240-2	3.8	324.0	5.6	182.0	4.0	86.4	4.3	87.5	3.8	109.6
Ⅰ-1035	2.6	166.0	1.0	96.6	1.6	83.3	1.6	136.0	1.0	116.0
Humeng 1	2.3	173.0	2.6	110.0	1.0	88.0	1.0	65.0	0.6	21.0
CIP-22	3.0	136.0	2.0	90.0	1.0	95.0	1.0	40.0	1.0	18.0
Xiao×Duo	1.0	180.0	1.0	160.0	1.0	140.0	1.0	90.0	1.0	30.0

注：表中数字为5瓶平均值，三角瓶50ml，光照强度200×400 lx，每日10小时光照，No.为每瓶薯块数，T.W为每瓶薯块重。

Note: 1. The table 2 indicate the average value per flask calculated in 5 flasks basis, No. = Number of tubers, T. W = Tubers weight. As the volume of a flask is only 50 cm^3, so the values present are comparatively lower.

2. The intensity of illumination is 200—400 lx, 10 h per days.

3. CCC = Chlorocholine chloride.

表 3　β-蜕皮激素和低浓度CCC对试管结薯的影响

Table 3　Effect of β-ecdysone with CCC at low concentration on *in vitro* tuberization

		培养天数 Days of the culture							
		0	14	21	28	35	42	73	73
供试品种 Genotypes	培养基 Media	薯块数/瓶 Number of tubers per flask							薯块重/个 Weight per tuber (mg)
CIP-22	M3	0	1.4	1.4	2.8	2.6	3.8	5.2	176.0
	M2	0	0	0	1.0	1.8	3.8	6.8	80.1
I-1035	M3	0	0.2	1.0	2.6	4.0	4.0	4.0	117.5
	M2	0	0	0.6	3.0	3.0	3.3	8.3	71.0
Huinkul	M3	0	1.0	1.3	2.0	2.0	3.3	4.0	194.0
	M2	0	1.3	1.3	3.3	3.6	4.0	4.0	157.0

注：M3 = MS + BAP 5.0 mg/l + β-ecdysone 2.0 mg/l + CCC 50 mg/l + 蔗糖 8 %

M2 = MS + BAP 5.0 mg/l + 蔗糖 8 %

Note: See notes to Tab. 2.

M3 = MS + BAP 5.0 mg/l + β-ecdysone 2.0 mg/l + CCC 50 mg/l + sucrose 8 %

M2 = MS + BAP 5.0 mg/l + sucrose 8 %.

表4 白糖和蔗糖对试管结薯的作用比较

Table 4 A comparison of the effect of sucrose and powdered sugar on *in vitro* tuberization

培养基 Media	供试品种 Genotypes	薯块数/瓶 Tuber number per flask			薯块重/瓶 Tuber weight per flask (mg)	薯块重/个 Mean weight of tuber (mg)
		培养7天 7 days	培养14天 14 days	培养21天 21 days	培养21天 21 days	培养21天 21 days
M2	CIP—22	0	0.25	3.0	97.50	32.50
(Sucrose 8 %)	Huinkul	3.50	8.25	11.25	662.0	58.80
	I—1035	0	1.30	4.50	379.20	48.60
M2	CIP—22	0	0	4.0	75.0	18.75
(Sugar 8 %)	Huinukl	4.60	8.40	11.60	1118.0	96.30
	I—1035	0.25	2.0	4.6	677.0	61.20

注：培养容器为100ml三角瓶，表中数字为5瓶平均值数。

Note: The figures indicate the average value calculated on 5 flasks basis. The volume of each flask is 100 cm^3.

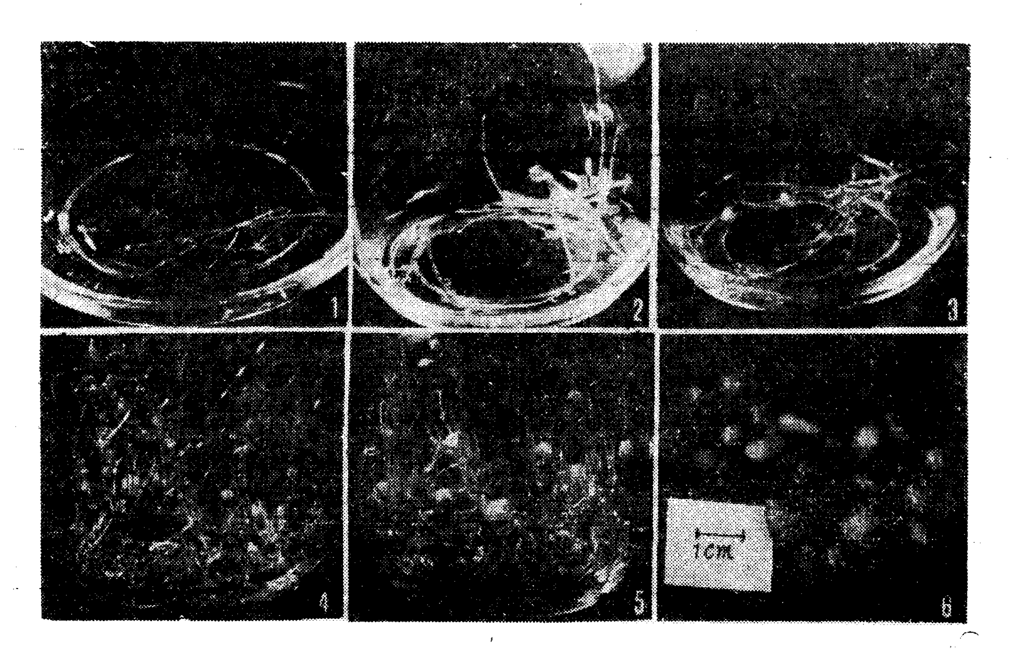


图2 1.将带有3—4个节的茎段置入M1液体培养基；2.7—10天后，每一茎段发育成带有3—4个节的新枝条；3.将带有3—4个新枝条的茎段摇倒；4.7—10天后，在摇倒的茎段上，腋芽发育成带有3^2—4^2个枝条的苗丛；5.换入M2诱导结薯培养基20天后，诱导出大量的小块茎；6.收获后的小块茎。

Fig 2. 1. A length of shoot with 3—5 nodes cut off from cultured virusfree plantlet is to be inoculated into a jam bottle contained M—1 Medium. 2. After 7—10 days, 4—5 new branches grow up from a length of every shoot. 3. The branches are fallen into liquid medium. 4. In another 7—10 days, the fallen branches may be proliferated to 3^2—4^2 shoots in same container. 5. M—1 medium is replaced by M—2 medium, a lot of tuberlets will be induced in the container after 20 days. 6. harvested tuberlets

液体震荡培养增殖茎段—暗培养诱导结薯等三个阶段，转接次数较多，操作较繁，且需要震荡器和暗室等设备。本研究对此方法作了简化和改进，从增殖小苗到诱导结薯的整个过程，均采取在同一容器内浅层液体静置培养（图 2），从而减少了转接操作次数，避免了在转接过程中发生污染，既减少了设备，又不降低小苗增殖和块茎诱导的速度。两相比较，我们的方法具有较为简便、快速和成本低廉的特点，因而也更加适用于大规模的无病毒马铃薯超级原种的生产。

致谢　国际马铃薯研究中心(CIP)提供试验材料和经费；中国科学院北京植物研究所提供了部分试验材料；陈莲芬、胡群宝、王华、易永生同志参加部分工作。

参 考 文 献

1 Hussey G, Stacey N. *J Ann Bot* 1981; **48**: 787—796
2 Wang P J, Hu C Y. *Ann Potato J* 1982; **56**: 33—37
3 Kim Y C. In vitro tuber formation from aseptical maintenance, Ph. D. theses. South Korea. 1982
4 Hussey G, Stacey N. *J Ann Bot* 1984; **53**: 565—578
5 Schilde-Rentschler L, Schmiedche P E. *CIP Circular* 1984; 12(1): 1—6
6 Tovar P, Estrada R, Schilde-Rentschler L et al. *CIP Circular* 1985; 13 (4); 1—4
7 Estrada R, Tovar P, Dodds J H. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1986; **7**: 3—10
8 Espinoza N O, Estrada R, Tovar P et al. Specialised Technolgy Document CIP, Lima. 1984
9 王军，王家旺. 植物生理学通讯 1984; (6): 35—38
10 何静波，胡忠，彭丽萍. 植物生理学报 1980; 6 (4): 369—375

IMPROVEMENTS IN INDUCING IN VITRO TUBERS OF POTATO

He Jingbo, Duan Jinyu, Wan Yong*, Wang Jun*

(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)

(**Department of Biology, Yunnan Normal University, Kunming*)

Abstract A series of experiments were conducted to improve the induction of *in vitro* tuberization of potato. The results showed that a length of shoot with 3 to 4 nodes cut off from *in vitro* potato plantlet could be proliferated to 3^2 to 4^2 shoots in 2 to 3 weeks when it was cultured in static shallow liquid Murashige-Skoog medium which had been added with some growth agents. Then these shoots would initiate tuberization in 1 to 3 weeks just after replacing the existing medium by the tuber inducing medium into the same container. In another 3 to 4 weeks, these tuberlets matured and were capable of sprouting. They could be harvested as virusfree prebasic seedpotatoes for either further propagation or direct utilization. By this improved method, the process of the propagation of virusfree tuberlets was much accelerated. Also the cost of material and labor was decreased and the quantity of the virusfree prebasic seedpotatoes was greatly increased.

The effects of hormones and the application of the improved management to the production of the virusfree seedpotatoes, are discussed in this paper.

Key words *in vitro* tuberization; Propagation of virusfree seedpotatoes